Zur Kenntnis der Phosphorsäureester des Kohlehydratstoffwechsels

Verkürzte Fassung der

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung

der Philosophischen Fakultät der Universität Basel

von

HEINRICH SULLMANN

aus

Dissen, Provinz Hannover

(Deutschland)

BASEL 1937

VERLAG WILLY DÖHNEL

Genehmigt von der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der Philosophischen Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren
H. O. L. FISCHER und H. RUPE

Basel, den 22. Juni 1937

Professor Dr. H. ZICKENDRAHT
Dekan

Herrn Heinrich Süllmann wurde von der Mathematisch-naturwissenschaftl. Abteilung der Philosophischen Fakultät der Universität Basel am 22. Juni 1937 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner Inaugural-Dissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

Zur Kenntnis der Phosphorsäureester
des Kohlehydratstoffwechsels

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. Im Chemischen Institut der Universität Basel;
2. In der Universitätsbibliothek Basel;
3. In der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I.

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiete des biologischen Kohlehydratabbaus bedeutsame Fortschritte erzielt. Es wurden sowohl mehrere beim Kohlehydratabbau durch die pflanzliche oder tierische Zelle auftretende Intermediärprodukte isoliert und identifiziert, als auch eine Reihe wichtiger enzymchemischer Kenntnisse gewonnen.

Die Betrachtung der summarischen Zerfallsgleichungen:

A. $C_6H_{12}O_6 = 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$ (alkoholische Gärung)

B. $C_6H_{12}O_6 = 2\ CH_3CHOHCOOH$ (Glykolyse)

lassen bereits erkennen, daß es sich beim biologischen Kohlehydratabbau nicht um einen einfachen Zerfall des Kohlehydratmoleküls handeln kann. Diese Erkenntnis führte dazu, nach einem „Zerfallsschema", das die intermediär auftretenden Durchgangsstufen des Kohlehydratabbaus wiedergibt, zu suchen (vgl. die zusammenfassende Darstellung von *O. Meyerhof* [1]). Seit der Beobachtung von *Buchner* [2]), daß anorganisches Phosphat die Gärung fördert und seit der wichtigen Entdeckung von *Harden* und *Young* [3]), daß bei der Hefegärung eine Veresterung anorganischen Phosphats stattfindet, wurde der Rolle der Phosphorsäure im biochemischen Kohlehydratabbau steigende Beachtung geschenkt. Wir wissen heute, daß im anaeroben Kohlehydratabbau — wenigstens was die am besten untersuchten Systeme Hefe und Muskel anbetrifft — eine ganze Reihe von Phosphorsäureestern auftritt: Hexosemonophosphorsäuren (*Robison-* und *Neuberg*-Ester), Hexosediphosphorsäure (*Harden-Young*-Ester), Glycerinaldehydphosphorsäure (*H. O. L. Fischer* u. *E. Baer*), Dioxyacetonphosphorsäure, α-Glycerinphosphorsäure, Phosphoglycerinsäure, Phosphobrenztraubensäure.

Das *Embden-Meyerhof*'sche Abbauschema nimmt seinen Ausgangspunkt vom *Harden-Young*-Ester. Dieser Ester zerfällt mit Hilfe der Zellfermente in 2 Moleküle Triosephosphorsäure, die über

die Dismutationsprodukte (Glycerinphosphorsäure bezw. Phosphoglycerinsäure) schließlich in die Endprodukte Milchsäure bezw. Alkohol übergehen.

Die Bildung von 2 Molekülen Triose aus einem Molekül Hexose in der Zerfallsstufe des biologischen Kohlehydratabbaus läßt die Frage entstehen, ob und wodurch das Kohlehydratmolekül in der Weise labilisiert ist, daß die Kohlenstoffbindung zwischen den C-Atomen 3 und 4 mit Hilfe der Enzyme gelöst wird. Da, wie erwähnt, der biologische Abbauweg über Kohlehydratphosphorsäure verläuft, liegt die Annahme nahe, daß die Veresterung mit Phosphorsäure eine solche Labilisierung des Kohlehydratmoleküls bewirkt. Es liegen auch bereits Untersuchungen vor, die auf chemischem Wege eine gewisse Auflockerung im Kohlehydratmolekül durch Veresterung mit Phosphorsäure zeigten (vgl. *Ohle*, Chemie der Monosaccharide und der Glykolyse). Allerdings konnte bisher chemisch ein Abbau von Hexosen bezw. ihren Phosphorsäureestern in der spezifischen Weise des biologischen Abbauweges nicht erzielt werden. Diese Aufgabe wird bis zur Triosestufe vielleicht mit Hilfe eines geeigneten Katalysators, der, wie die Zymohexase, lediglich den Zerfall des (labilisierten) Hexosephosphorsäureesters beschleunigt, gelöst werden können.

II.

In der vorliegenden Arbeit (Teil 2 des experimentellen Kapitels: „Der Kohlehydratstoffwechsel der Linse. I. Die Bildung von Phosphorsäureestern in der Linse“ der Dissertation erschien im Archiv für Augenheilk. *110* (1937)), wurde die oxydative Spaltung des *Harden-Young*'schen Esters (Fructose-1,6-diphosphorsäure) untersucht. Dabei könnten möglicherweise gleiche oder ähnliche Spaltprodukte erhalten werden, wie sie beim biologischen Kohlehydratabbau auftreten. Als Oxydationsmittel wurde Überjodsäure (HJO_4 bezw. hydratisiert H_5JO_6) gewählt, die zuerst von *Malaprade* [4]) als ein spezifisches Oxydationsmittel zur Spaltung von α-Glykolen angegeben wurde. Über den Mechanismus der Perjodsäureoxydation vgl. *Crigee* [5]). Überjodsäure greift nur freie, benachbarte Glykolgruppen unter Spaltung der C—C-Bindung an, und zwar erfolgt die Spaltung leicht bei cis-ständigen, schwerer bei trans-ständigen OH-Gruppen. Die Spaltung von Glukose mit Überjodsäure wurde bereits von *Karrer* [6]) untersucht.

Der Verlauf der oxydativen Spaltung der Hexosediphosphorsäure mit Perjodsäure läßt sich nicht eindeutig vorhersagen. Legen wir die Halbacetalformel zugrunde, so kann die Spaltung nur zwischen den C-Atomen 3 und 4 erfolgen. Das Resultat dieser Spaltung würde Oxymethylglyoxalphosphorsäure und Glycerinaldehydphosphorsäure sein. Legen wir statt der Halbacetalformel die offene Formel des Esters zugrunde, so erscheint der mögliche Reaktionsverlauf unübersichtlicher, da wir 3 benachbarte OH-Gruppen vor uns haben.

Aus meinen Untersuchungen ergab sich, daß die oxydative Spaltung der Hexose-diphosphorsäure in nicht völlig übersichtlicher Weise erfolgte. Deshalb untersuchte ich auch die Oxydation der β-Methylhexose-diphosphorsäure, da mit dieser Substanz ein übersichtlicherer Reaktionsverlauf zu erwarten war.

Im Laufe der Untersuchungen erwies es sich als nützlich, ein Salz der Glykolaldehyd-phosphorsäure darzustellen, um die Eigenschaften dieses Phosphorsäureesters mit Oxydationsprodukten der Hexosediphosphorsäure zu vergleichen. Weiterhin wurde die Oxydation der Trioxyisobuttersäure mit Perjodsäure und Bleitetraacetat sowie des Methylesters der Trioxyisobuttersäure mit Bleitetraacetat untersucht.

III.

1. Titration von hexosediphosphorsaurem-Ca mit Perjodsäure.

Versuch 1: 50 mg Ca-Salz (= 5,62 mg P = 15,9 mg Hexose) + 10 ccm H_2O + 10 ccm Perjodsäure; eine Stunde stehen gelassen, dann titriert.

Titration:

Leerversuch:	74,80	ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	71,50	„	„	„
Verbrauch:	3,30	„	„	„

= 29,8 mg 0/180 mg Hexose.

Versuch 2: Wie Versuch 1, aber acht Stunden mit Perjodsäure stehen gelassen.

Titration:

Leerversuch:	74,80 ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$	
Oxyd.-Versuch:	70,80 „	„	„	
Verbrauch:	4,00 „	„	„	

= 36,2 mg O/180 mg Hexose.

Diese Titrationsversuche zeigen, daß eine Oxydation stattfindet, bei der mehr Sauerstoff verbraucht wird, als der Lösung einer Kohlenstoffbindung entspricht. Der zeitliche Verlauf der Oxydation läßt die Annahme zu, daß sich bei der Oxydation noch sekundäre Reaktionen abspielen, etwa eine partielle Weiteroxydation der Spaltstücke.

2. Titration von β-Methylhexosediphosphorsäure.

Das verwendete Ba-Salz enthielt 8,4 % H_2O und 8,75 % P. Die Oxydation des β-Methyläthers mit Perjodsäure erfolgt außerordentlich langsam. Deshalb wurde in einer Versuchsreihe der zeitliche Verlauf der Oxydation bestimmt. In der nachstehenden Tabelle 1 sind die Versuchsdaten enthalten.

Tabelle 1

mg Ba-Salz	Zeit	Verbrauch ccm n/10 $Na_2S_2O_3$	Theoretischer Verbrauch *)	%
42,8	2 h	0,47	1,20	39
68,2	5 h	1,05	1,92	55
33,8	17 h	0,87	0,948	92
48,0	25½ h	1,29	1,346	96
47,8	52 h	1,45	1,34	(108)
28,4	69 h	0,78	0,796	98
71,9	99 h	2,08	2,08	103

*) Berechnet nach 2 P = 1 O.

Es ergibt sich, daß erst nach mehr als 25 Stunden Einwirkung der Perjodsäure eine Sauerstoffmenge verbraucht ist, die annähernd der Spaltung einer C—C-Bindung entspricht. Eine

wesentliche Ausdehnung der Oxydationszeit (bis 99 Stunden) bewirkt keinen Sauerstoffverbrauch, der merklich über den theoretischen Verbrauch (1 Molekül Methyläther = 1 Atom O) hinausgeht. Wir können aus den Titrationszahlen also schließen, daß nur eine Kohlenstoffbindung gelöst wird. Der langsame Oxydationsverlauf wird dadurch zu erklären sein, daß die beiden benachbarten OH-Gruppen trans-ständig sind.

3. Titration von α-Glycerinphosphorsäure [7]).

0,10 g Ba-Salz der Aceton-glycerin-α-phosphorsäure (nach *E. Fischer* u. *Pfähler*[8]) wurden in 3 ccm Wasser suspendiert, mit 1 ccm 1–n Essigsäure versetzt und 30 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Zu der abgekühlten Lösung wurden 5 ccm Perjodsäure-Lösung gegeben und 2 Stunden einwirken gelassen.

Titration:

Leerversuch:	37,70 ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	32,70 „	„	„
Verbrauch:	5,00 „	„	„

= 16,15 g 0/1 Mol α-Glycerinphosphorsäure.

Die Titration zeitigt hier also dasselbe Endergebnis wie mit dem Methylglucosid. Bei der Oxydation wurde keine Phosphorsäure abgespalten. Nach Entfernung des überschüssigen Perjodats und des Jodats reduzierte die Lösung Fehling'sche Lösung stark.

4. Titration der Trioxyisobuttersäure mit Perjodsäure.

Trioxyisobuttersäure wurde als Ca-Salz mit 4 Mol H_2O nach der Vorschrift von *E. Fischer* und *J. Tafel* [8]) dargestellt.

Versuch 1: 50,0 mg Ca-Salz wurden in 20 H_2O gelöst und mit 10 ccm Perjodsäure (ca. 1%-ig) zehn Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Titration:

Leerversuch:	27,15 ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	20,40 „	„	„
Verbrauch:	6,75 „	„	„

= 1,53 Atome Sauerstoff pro Mol Substanz.

Versuch 2: 25,0 mg Ca-Salz, weiter wie oben, aber 25 Minuten stehen gelassen.

Titration:

Leerversuch:	27,10	ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	21,50	„	„	„
Verbrauch:	5,60	„	„	„

= 2,54 Atome Sauerstoff pro Mol Substanz.

Die beiden Versuche zeigen, daß die Spaltung nicht nur an einer Stelle des Moleküls stattfindet. Wahrscheinlich ist der über 1 Atom pro Molekül Trioxyisobuttersäure hinausgehende Sauerstoffverbrauch durch die OH-Gruppe des Carboxyls bedingt (siehe weiter bei der Oxydation des Trioxyisobuttersäure-methylesters).

5. Oxydation der Trioxyisobuttersäure mit Bleitetraacetat.

Durch Umsetzung mit der äquivalenten Menge Oxalsäure und Ausfällung der freien Säure mit Alkohol wurde aus dem Ca-Salz die freie Trioxyisobuttersäure dargestellt. Die Säure wurde auf Ton, dann 1 Stunde im Hochvakuum bei der Temperatur des siedenden Acetons getrocknet.

Versuch 1: 35,2 mg Trioxyisobuttersäure wurden unter leichtem Erwärmen in 10 ccm Eisessig gelöst. Zu der Lösung wurden 10 ccm Pb-ac_4-Lösung (2,2 g Pb-ac_4 in 50 ccm Eisessig) gegeben. 1 Minute danach tritt Trübung auf. Nach zehn Minuten wurden 30 ccm KJ-Na-acetat-Lösung zugegeben und das ausgeschiedene Jod mit n/10 $Na_2S_2O_3$ titriert.

Titration:

Leerversuch:	19,30	ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	12,20	„	„	„
Verbrauch:	7,10	„	„	„

= 1,37 Atome Sauerstoff pro Mol Substanz.

Versuch 2: 66,6 mg Trioxyisobuttersäure, weiter wie oben, aber 30 Minuten mit Pb-ac_4 stehen gelassen.

Titration:

Leerversuch:	19,30	ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	3,60	„	„	„
Verbrauch:	15,70	„	„	„

= 1,60 Atome Sauerstoff pro Mol Substanz.

Der nach dem Pb-ac_4 entstehende Niederschlag wurde isoliert. Die erhaltene Substanz ist das Pb-Salz einer stark reduzierenden Säure (höchstwahrscheinlich Oxybrenztraubensäure).

6. Oxydation des Trioxyisobuttersäure-methylesters.

89,0 mg Methylester (dargestellt durch Methylieren der freien Säure mit Diazomethan) wurden in 10 ccm Eisessig gelöst und mit 10 ccm n/10 Pb-ac_4-Lösung versetzt. Es entsteht keine Trübung. Nach 25 Minuten wurde titriert.

Titration:

Leerversuch:	20,55 ccm	n/10	$Na_2S_2O_3$
Oxyd.-Versuch:	10,20 „	„	„
Verbrauch:	10,35 „	„	„

= 1,04 Atome Sauerstoff pro Mol Substanz.

Ist also die carboxylische OH-Gruppe gesperrt, so entspricht der Sauerstoffverbrauch der Lösung einer C—C-Bindung.

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs, wie sie in diesen Versuchen durchgeführt wurde, ergibt mithin, daß die oxydative Spaltung der Hexosediphosphorsäure mit Perjodsäure unter den Versuchsbedingungen keine übersichtlich zu formulierende Reaktion darstellt. Ebensowenig einfach verläuft die Oxydation der Trioxyisobuttersäure mit Perjodsäure und Bleitetraacetat. Dagegen ergibt sich bei der Oxydation der α-Glycerinphosphorsäure mit Perjodsäure und des Trioxyisobuttersäure-methylesters mit Bleitetraacetat ein Sauerstoffverbrauch, der dem für die Spaltung einer C—C-Bindung entspricht.

7. Glykolaldehydphosphorsäure-Ca.

1,0 g aceton-glycerin-α-phosphorsaures Barium wurden mit 5 ccm n/1 CH_3COOH und 2 ccm 2 n H_2SO_4 versetzt und $\frac{1}{2}$ Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wurden in die Lösung 0,5 g Überjodsäure krist. eingetragen und unter häufigem Umrühren 2 $\frac{1}{2}$ Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurden 2,6 g KJ zugegeben und das ausgeschiedene Jod mit Äther extrahiert. Zu der extrahierten Lösung wurde 1 ccm 32%ige Ca-acetat-Lösung und 15 ccm 96%iger Äthylalkohol gegeben. Die entstehende weiß-flockige Fällung wurde abzentrifugiert, im Zentrifugenglas wiederholt mit Alkohol und zuletzt

mit Äther gewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Die Substanz reduzierte ammoniakal. $AgNO_3$-Lösung. Der Ester ist in n/1 HCl /100° bereits nach 5 Minuten zur Hälfte hydrolisiert. Wie die Berechnung der Reaktionskonstanten für die einzelnen Hydrolysezeiten zeigte, liegt ein einheitlicher Ester vor.

Analyse: gef. 17,55 % P; ber. für $C_2H_3O_5PCa$: 17,84 % P.

8. Charakterisierung der bei der Oxydation der Hexosediphosphorsäure auftretenden Spaltstücke.

Eine Charakterisierung der bei der Perjodsäure-Oxydation der Hexosediphosphorsäure wurde zunächst durch Aufnahme der Hydrolysenkurven versucht. Zusammenfassend ergeben die Hydrolysenversuche, daß in der Oxydationslösung ein im Verhältnis zur Hexosediphosphorsäure (die verwendete Hexosediphosphorsäure spaltete in 3 Stunden in n-HCl/100° 90 % des organ. P ab) schwerer hydrolysierbarer Ester vorliegt. Der anfänglich steile Verlauf der Hydrolysenkurven von Oxydationslösungen dagegen kann einem relativ leichter hydrolysierbaren Esteranteil zugerechnet werden. Der leichter hydrolysierbare Anteil ist nach 60 Minuten langer Hydrolyse in 2 n-HCl gespalten; im weiteren Verlauf liegt der schwer hydrolysierbare Teil als eine einheitliche Verbindung vor, wie die Konstanten in Tabelle 2 zeigen. Aus den Hydrolysen kann mithin geschlossen werden, daß bei der Oxydation der Hexosediphosphorsäure mit Perjodsäure mindestens zwei P-haltige Bruchstücke entstehen: ein leicht hydrolysierbarer und ein schwer hydrolysierbarer Ester.

Tabelle 2

Hydrolyse der Oxydationslösung in 2 n – HCl/100°.

Zeit in Minuten	% P abgespalten	$K \cdot 10^{-3}$
10	32,4	45,7
25	44,3	5,6
60	49,2	1,4 ←
120	52,1	0,43
180	55,2	0,48
240	57,7	0,42
360	61,0	(0,29)
420	63,6	0,50

Der schwer hydrolysierbare Esteranteil wurde aus der Oxydationslösung als Ba-Salz isoliert. Seine Hydrolyse ergab, daß nach annähernd 6 stündiger Hydrolyse in n/1 HCl/100° erst 30 % des gebundenen Phosphats mineralisiert sind. Wurde der Ester mit Brom oxydiert, so spaltete das erhaltene Ba-Salz bei der Hydrolyse in n/1 HCl und bei 120° (Glycerinbad) nach 30 Minuten nur 1,05 %, und nach 90 Minuten 3,12 % des gesamten Phosphats ab.

Aus verhältnismäßig konzentrierten Lösungen konnte nach der Oxydation und Entfernung der Perjodsäure mit Silberacetat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein Phosphor-haltiges Hydrazon isoliert werden. Jedoch schwankten die Analysendaten in mehreren Versuchen beträchtlich, sodaß das Hydrazon nicht einwandfrei identifiziert wurde. — Es erscheint möglich, daß die Behandlung der Oxydationslösung mit Silberacetat, wie sie in fast allen Versuchen zur Entfernung des überschüssigen Perjodats vorgenommen wurde, durch eine oxydierende Wirkung des Silbers zu einer Veränderung der oxydativ entstandenen Spaltstücke führt.

Literatur:

[1]) Helv. chim. A. *18*, 1030; 1935.

[2]) Die Zymasegärung, München u. Berlin 1903.

[3]) Proc. chem. Soc. *21*, 189; 1905.

[4]) Bull. *43*, 683; 1928.

[5]) Sitzungsber. d. Ges. z. Bef. d. ges. Naturw. Marburg *69*, 25; 1934.

[6]) Helv. chim. A. *16*, 959; 1933.

[7]) Vgl. *Fleury* u. *Lange*, J. Pharm. Chim. *17*, 196; 1933.

[8]) Ber. *22*, 106; 1889.

Lebenslauf.

Heinrich Süllmann, geboren am 19. Januar 1907 in Dissen (Provinz Hannover). Schulbesuch: 4 Jahre Volksschule, dann 5 Jahre Mittelschule (Reifezeugnis, früheres Einjährigen-Zeugnis).

Zur Vorbereitung auf den Ingenieurberuf arbeitete ich 2 Jahre (1921—1923) auf einem Hüttenwerk. In der Folge suchte ich eine chemische Ausbildung in folgenden Instituten: Landwirtschaftliche Versuchsstationen Osnabrück, Wiesbaden, Darmstadt, Preußische Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel (1923—1927); von 1927—1930 war ich im wissenschaftlichen Laboratorium der Chemisch-pharmazeutischen A.-G. Bad Homburg tätig. Nach kurzem Aufenthalt (Herbst 1930) an der deutschen Universität in Prag trat ich als Privatassistent von Herrn Prof. *Spiro* in die physiologisch-chemische Anstalt der hiesigen Universität ein (1930—1932). Vom 1. November 1932 bis 1. November 1936 war ich Assistent an der physiologischen Anstalt (Prof. *Verzár*); seit 1. November 1936 bin ich Assistent an der hiesigen Augenklinik (Prof. *Brückner*). — Im Januar 1933 erhielt ich nach einer Prüfung im preußischen Kultusministerium in Berlin das Reifezeugnis (Berechtigung zum Universitätsstudium).

In Basel hörte ich die Vorlesungen der Herren Professoren und Dozenten: *Bernoulli*, *Erlenmeyer*, *Fichter*, *Fischer*, *Geiger*, *Ruggli*, *Rupe*, *Schmalenbach*, *Senn* und *Spiro*.